



University of Groningen

## Molecular dissection of Staphylococcus aureus virulence

Zhao, Xin

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Zhao, X. (2020). *Molecular dissection of Staphylococcus aureus virulence*. [Groningen]: University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## **Chapter 6**

**Nederlandse samenvatting**

**Biography**

**List of publications**

**Acknowledgements**

## Nederlandse samenvatting

De ziekteverwekker *Staphylococcus aureus* is altijd een serieuze bedreiging geweest voor de gezondheid en het welzijn van de mens. Door de ontwikkeling en klinische beschikbaarheid van antibiotica werd het mogelijk om infecties, veroorzaakt door deze bacterie, te bestrijden. In de afgelopen jaren is dit echter in toenemende mate bemoeilijkt door het ontstaan van *S. aureus*-varianten die resistenties tegen de meest toegepaste antibiotica hebben verworven. Tegenwoordig vormt de meticilline-resistente *S. aureus* (MRSA) wereldwijd één van de meest serieuze bedreigingen voor onze gezondheid. Dit probleem wordt nog vergroot door de steeds verder toenemende levensduur van de mens, waardoor het aantal zwakke en immuungecompromitteerde individuen die gevoelig zijn voor *S. aureus*-infecties in het algemeen en MRSA-infecties in het bijzonder steeds verder toeneemt. In dit opzicht zijn de snel-overdraagbare en hoog-virulente MRSA-varianten die in gemeenschappen van gezonde mensen zijn opgedoken het meest problematisch. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift is de epidemiologie van de MRSA-verspreiding dramatisch veranderd gedurende de afgelopen twintig jaar. MRSA-infecties waren oorspronkelijk alleen een probleem in ziekenhuizen en zorginstellingen voor ouderen, maar deze multi-resistente ziekteverwekker heeft nu zijn territorium uitgebreid naar jonge gezonde mensen en de veestapel.

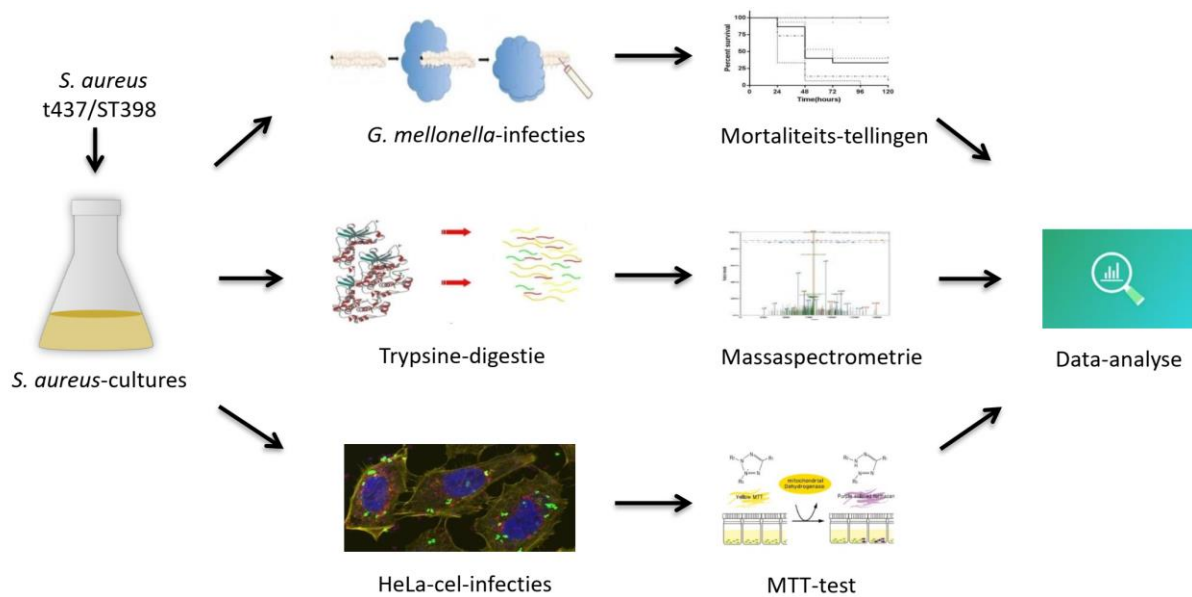
Om MRSA-uitbraken in ziekenhuizen of onder gezonde mensen op te sporen en vervolgens onder controle te krijgen, staat ons een aantal moleculaire typeringsmethodes ter beschikking, waaronder de multi-locus sequentie-typering (MLST). Dergelijke typeringsmethodes hebben bijvoorbeeld een aantal jaren geleden geleid tot de ontdekking, dat de *S. aureus*-lijn met het sequentie-type 398 (ST398) wijdverspreid was in de grootschalige veehouderij. Deze lijn wordt daarom in het Engels “livestock-associated” (LA) *S. aureus* genoemd. Recentelijk zijn er echter ook *S. aureus* ST398-varianten waargenomen die zich onafhankelijk van de veehouderij onder gezonde mensen verspreiden. Gelukkig zijn deze *S. aureus* ST398-varianten van humane origine veelal meticilline-gevoelig (in het Engels “methicillin sensitive *S. aureus*”; MSSA). Epidemiologische studies hebben laten zien, dat de overdracht van *S. aureus* ST398 onder gezonde mensen in veel landen geassocieerd is met de aanwezigheid van de *chp*-, *scn*- en *sak*-

genen die coderen voor eiwitten die de bacterie helpen om te ontsnappen aan het humane immuunsysteem. Dergelijke waarnemingen laten zien, dat epidemiologische studies belangrijke inzichten kunnen verschaffen in de moleculaire eigenschappen van nieuw-opduikende *S. aureus*-varianten die zich vervolgens wereldwijd verspreiden. Dergelijke studies geven derhalve waardevolle waarschuwingssignalen af die benut kunnen worden om de verspreiding van gevaarlijke infecties tegen te gaan. Een belangrijke beperking van de meest-gangbare typeringsmethodes is echter dat ze uitsluitend informatie verschaffen over variaties in het genoom van de geïsoleerde *S. aureus* bacteriën, maar niets zeggen over de expressie van de door het genoom gecodeerde genen. Informatie over de gen-expressie is echter van doorslaggevend belang om zinvolle uitspraken te kunnen doen over antibioticumresistentie en het ziekmakende vermogen, ofwel de virulentie, van *S. aureus*-isolaten.

In de afgelopen jaren is het duidelijk geworden, dat het vermogen van *S. aureus* om ziekte te veroorzaken berust op de expressie van een veelvoud aan genen voor factoren die op het oppervlak van de bacterie gelocaliseerd zijn of die de bacterie in zijn leefmilieu uitscheidt. De meeste van deze virulentiefactoren zijn eiwitten die *S. aureus* in staat stellen om zich te hechten aan de cellen en weefsels van de gastheer en om het immuunsysteem te ontwijken. Dergelijke eiwitten stellen de bacterie zo in staat om acute infecties te veroorzaken. Zogenaamde proteomics-technieken, waarmee alle eiwitten van een organisme tegelijkertijd geïdentificeerd kunnen worden, zijn buitengewoon nuttig gebleken om gedetailleerde informatie te verschaffen over het eindresultaat van de bacteriele gen-expressie, ofwel de productie van eiwitten. Dergelijke technieken vormen daarom een krachtig hulpmiddel om de bacteriële productie van virulentiefactoren in kaart te brengen en om de diversiteit in de expressie van deze factoren, die gezamenlijk bijdragen aan het vermogen van de bacterie om ziekte te veroorzaken, zichtbaar te maken. Om een beter inzicht te krijgen in het epidemiologische gedrag en de virulentie van *S. aureus* werd daarom in het onderhavige promotieonderzoek een experimentele pijplijn ontwikkeld om klinische *S. aureus*-isolaten te karakteriseren met betrekking tot de productie van virulentiefactoren en hun daadwerkelijke

vermogen om ziekte te veroorzaken. Deze pijplijn, die schematisch is weergegeven in Figuur 1, werd toegepast om de meest-relevante virulentiefactoren te identificeren, zodat ze als mogelijke merkers voor toekomstige infectiepreventiedoeleinden kunnen dienen. Door twee geheel verschillende infectiemodellen in de pijplijn op te nemen kon deze ook benut worden om nieuwe activiteiten van reeds bekende virulentiefactoren te identificeren of om geheel nieuwe virulentiefactoren van *S. aureus* te identificeren. Verder is het vermeldenswaardig, dat de uitgevoerde proteoom-analyses voornamelijk gericht waren op het bacteriële exoproteoom, dat alle uitgescheiden eiwitten omvat. Deze focus op het exoproteoom was ingegeven door het feit dat deze eiwitfractie het voornaamste reservoir van virulentiefactoren vertegenwoordigt [1]. Een bijkomstig voordeel van de analyse van het exoproteoom is dat het minder complex van samenstelling is dan het cellulaire proteoom, aangezien slechts een klein percentage van alle geproduceerde eiwitten door de bacterie uitgescheiden wordt.

Om de virulentie van de onderzochte *S. aureus*-isolaten te bepalen werd de grote wasmot *Galleria mellonella* als infectiemodel gebruikt. Eerder onderzoek had namelijk laten zien, dat *G. mellonella* geschikt is om infecties te onderzoeken die veroorzaakt worden door verschillende opportunistische ziekteverwekkers, waaronder *S. aureus* [2]. In een separate studie, die niet in dit proefschrift is opgenomen, werd tevens aangetoond dat *G. mellonella* een geschikt diermodel is voor infecties met de orale ziekteverwekker *Porphyromonas gingivalis* [3]. Een belangrijk gegeven is dat bacteriën, die in de larves van *G. mellonella* geïnjecteerd worden, in de eerste plaats het aangeboren immuunsysteem van de wasmot moeten weerstaan, dat qua structuur en functie equivalent is aan het aangeboren immuunsysteem van zoogdieren en de mens [4]. Verder is het vermeldenswaardig dat eerder onderzoek heeft laten zien, dat de uitkomsten van infectieproeven met verschillende ziekteverwekkers in *G. mellonella* larves tot vergelijkbare resultaten leiden als infectieproeven in muizen [5].



**Figure 1. Schema van de pijplijn die gebruikt is om proteoom-signaturen te identificeren die specifiek zijn voor de virulentie van bepaalde *S. aureus*-lijnen.**

*S. aureus* ST59 met het zogenaamde *spa*-type t437 werd een aantal jaren geleden geïdentificeerd als één van de dominante MRSA-varianten die infecties veroorzaken onder de gezonde bevolking van Azië. Deze variant blijkt zich nu ook in Europa te verspreiden [6]. Moleculaire typering van isolaten die behoren tot deze variant liet zien, dat ze qua genomsequentie sterk op elkaar lijken, ongeacht de gastheer van wie ze geïsoleerd werden, het jaar van isolatie, of het land waar ze geïsoleerd werden. Deze MRSA-variant vertoont derhalve alle eigenschappen van *S. aureus*-varianten die zich snel onder gezonde mensen kunnen verspreiden [6]. Daarom werd het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 2** uitgevoerd, waarbij de exoproteomen en de virulentie van 20 representatieve klinische *S. aureus* t437-isolaten werden vergeleken. Een eerste opmerkelijke waarneming was dat, ondanks de grote overeenkomsten op genomniveau, de exoproteomen van deze isolaten een enorme heterogeniteit lieten zien. Slechts een paar eiwitten werden door alle onderzochte isolaten uitgescheiden, terwijl een betrekkelijk groot aantal eiwitten uniek bleek te zijn voor bepaalde isolaten. De analyses lieten ook zien, dat verschillende isolaten in bepaalde clusters gegroepeerd konden worden op grond van hun exoproteoomprofielen en dat de isolaten behorend tot eenzelfde cluster een vergelijkbare virulentie in de *Galleria* en HeLa-cel-

infectiemodellen vertoonden. Een vergelijkende analyse van de exoproteoom-data en de virulentie-assays wees tevens uit, dat bepaalde gesecreteerde eiwitten een cruciale rol spelen in de virulentie van isolaten die behoren tot de *S. aureus* t437 lijn. Tot deze virulentiefactoren behoren onder andere de IsaA en chitinase B eiwitten, een groep eiwitten die betrokken zijn bij ijzeropname uit het externe milieu van de bacterie (IsdA, IsdB, IsdE en IsdH), het EbpS-eiwit en het PVL-toxine.

Dezelfde pijplijn die gebruikt was voor de karakterisering van *S. aureus* met het *spa*-type t437 werd vervolgens ingezet voor de karakterisering van *S. aureus* ST398-isolaten, waarbij met name gekeken werd naar verschillen tussen de LA-varianten en varianten die van mens-op-mens overdraagbaar zijn [7]. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 3** werden in totaal 30 representatieve ST398-isolaten onderzocht op mogelijk cruciale virulentiefactoren. Een opmerkelijk resultaat was dat de LA-ST398-isolaten een hogere exoproteoom-heterogeniteit lieten zien dan de onder gezonde mensen overdraagbare ST398 isolaten, ondanks het feit dat de laatstgenoemde isolaten op genoomniveau minder met elkaar verwant zijn dan de LA-ST398-isolaten. Verdere vergelijking van de exoproteomen van de LA-ST398 en de humaan-overdraagbare ST398-isolaten liet zien, dat de geïdentificeerde eiwitten verschillende functies hebben in de pathogenese en het bacteriële metabolisme. Dit duidt op specifieke proteoom-aanpassingen die van belang zijn bij de gastheer-switch door *S. aureus* ST398 van de veestapel naar de humane populatie. Op basis van deze waarneming kan geconcludeerd worden, dat de gecombineerde genoom- en proteoom-data een gedetailleerd inzicht hebben verschaft in de moleculaire mechanismes die ten grondslag liggen aan de adaptatie van *S. aureus* ST398 aan een dierlijke of humane gastheer. Door de virulentie van ST398-isolaten in *Galleria*-larves en humane HeLa-cellen te onderzoeken kon worden aangetoond, dat de humaan-overdraagbare isolaten meer virulent en cytotoxisch zijn dan de LA-ST398-isolaten. Ook voor de *S. aureus* ST398-isolaten konden de exoproteoom-data gecorreleerd worden aan de virulentie in *Galleria*-larves en de toxiciteit voor HeLa-cellen. Tevens werden belangrijke virulentiefactoren van de *S. aureus* ST398-isolaten geïdentificeerd, waaronder de Sbi, SpA, SCIN en CHIPS eiwitten.

Tezamen laten de resultaten die beschreven zijn in de **Hoofdstukken 2 en 3** zien, dat de exoproteomen van *S. aureus*-isolaten met *spa*-type t437 of ST398 erg heterogeen zijn, ondanks het feit dat de respectievelijke genomen sterk overeenkomen. Aanzienlijke exoproteoom-heterogeniteit werd ook al eerder opgemerkt door de analyse van 25 klinische *S. aureus* isolaten uit één ziekenhuis [8]. Bij deze eerdere studie betrof het echter isolaten van verschillende types, met veel verschillende mobiele genomische elementen en aanzienlijke verschillen in de transcriptionele en post-transcriptionele gen-regulatie. Daarentegen werden betrekkelijk homogene exoproteomen recentelijk beschreven voor *S. aureus*-isolaten van het USA300 type die in Kopenhagen en omgeving verzameld waren [9]. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift laat daarentegen zien, dat de exoproteomen van isolaten met *spa*-type t437 of ST398 behoorlijk kunnen verschillen qua samenstelling. Dit betekent dat de mate van exoproteoom-heterogeniteit bij verschillende *S. aureus*-types waarschijnlijk afhangt van de respectievelijke types, hun geografische verdeling en de gastheer van wie ze zijn geïsoleerd. Een intrigerende waarneming was dat de exoproteoom-heterogeniteit onder *S. aureus* t437- en ST398-isolaten in grote mate bepaald werd door verschillen in de hoeveelheid extracellulaire cytoplasmatische eiwitten (in het Engels “extracellular cytoplasmic proteins” of ECPs). De excretie van ECPs in het extracellulaire milieu is een fysiologisch fenomeen, dat vaak wordt waargenomen bij *S. aureus* en vele andere micro-organismes [10]. Desondanks zijn de mechanismen die leiden tot de excretie van ECPs nog niet volledig opgehelderd. De meest populaire verklaringen voor de excretie van ECPs door *S. aureus* zijn: (i) destabilisatie van de celenvelop door het Atl autolysine [11], (ii) de productie van cytolytische toxines en (iii) de activiteit van bacteriofagen. De waargenomen variaties in ECPs bij de onderzochte *S. aureus* t437- of ST398-isolaten kon echter niet gecorreleerd worden aan de productie van het autolysine Atl. Daarentegen werden verschillende bacteriofaag-geassocieerde eiwitten uitsluitend in de exoproteomen van die t437- of ST398-isolaten aangetroffen die de meeste ECPs produceerden. Dit betekent dat bacteriofaag-activiteit wellicht verantwoordelijk is voor de excretie van ECPs door *S. aureus* t437- of ST398-isolaten. Hierbij moet wel opgemerkt worden, dat dit niet de verklaring kan zijn voor de excretie van ECPs door alle *S. aureus*



varianten, aangezien in een eerder onderzoek aangetoond werd, dat deletie van de profagen  $\phi 11$ , 12 en 13 uit het genoom van de *S. aureus*-stam 8325-4 geen aantoonbaar effect had op de vorming van ECPs [11]. Ebner *et al.* rapporteerden recentelijk dat de expressie van cytolytische PSM $\alpha$ -toxines de cytoplasmamembraan van *S. aureus* destabiliseert, hetgeen resulteert in de excretie van ECPs [12]. Helaas konden dergelijke PSM $\alpha$ -toxines niet in de exoproteomen van de geanalyseerde *S. aureus* t437- of ST398-isolaten aangetoond worden vanwege hun geringe grootte van 20-30 aminozuurresiduen. Dit betekent dat een rol van PSM-activiteit bij de vorming van ECPs in deze isolaten niet uitgesloten kan worden. Het lijkt echter aannemelijk, dat profaag-activiteit een belangrijke rol speelt bij de ECP-excretie door de onderzochte *S. aureus* t437- en ST398-isolaten.

Een belangrijke doelstelling van het onderzoek beschreven in **Hoofdstukken 2 en 3** was het identificeren van cruciale virulentiefactoren die bijdragen aan de pathogeniciteit van de onderzochte stammen. Zoals aangegeven in Figuur 1 werd dit onderzocht met behulp van de *G. mellonella* en HeLa-cel-infectiemodellen. Bij de t437 isolaten werd waargenomen, dat de eiwitten IsaA, IsdA, IsdB, IsdE, IsdH en chitinase B geassocieerd zijn met het doden van *G. mellonella*-larves. Een belangrijke vervolgbepinding was, dat een *S. aureus isaA* mutant geattenuëerd is in het *G. mellonella*-infectiemodel. Dit verklaart wellicht waarom het IsaA-eiwit een belangrijk antigeen van *S. aureus* is, dat zonder uitzondering door alle onderzochte klinische isolaten geproduceerd wordt [13]. Een rol van het IsaA-eiwit in de virulentie van *S. aureus* was nog niet eerder gerapporteerd en de huidige data ondersteunen het idee dat IsaA een veelbelovend doelwit is voor toekomstige profylactische of therapeutische interventies om *S. aureus*-infecties tegen te gaan. Daarnaast onderstreept de correlatie van exoproteoom-data met de resultaten verkregen met behulp van het HeLa-cel-infectiemodel de belangrijke rol van het pore-vormende PVL-toxine in de cytotoxiciteit van *S. aureus* t437-isolaten. Dit impliceert dat PVL-receptoren aanwezig zijn in de HeLa-cellen en dat HeLa-cellen een zeer veelzijdig infectiemodel vormen voor onderzoek naar de pathogeniciteit van, in de gemeenschap van gezonde mensen verworven, *S. aureus*-types die vaak de *pvl* genen bezitten. In het geval van *S. aureus* ST398 laten de resultaten in **Hoofdstuk 3** zien, dat de Sbi-

en SpA-eiwitten belangrijke virulentiefactoren zijn die een rol spelen bij de infectie van *G. mellonella* larves, aangezien *S. aureus* bacteriën zonder de *spa* of *sbi* genen geattenuëerd waren in dit infectiemodel. De SpA- en Sbi-eiwitten waren eerder beschreven als belangrijke factoren voor het ontwijken van het immuunsysteem door hun vermogen om immunoglobuline G (IgG) te binden, waardoor de bacteriën het humane immuunsysteem kunnen ontwijken door verminderde opsonofagocytose. Het is echter ook eerder beschreven, dat het SpA-eiwit de klassieke complementroute kan beïnvloeden door binding aan de TNF $\alpha$  receptor [14] en dat dit van belang is voor de virulentie van *S. aureus* in een muizenmodel voor septische artritis [15]. Daarnaast was eerder aangetoond, dat Sbi niet alleen IgG bindt, maar ook het complement-eiwit C3, om destructie door het immuunsysteem te voorkomen [16]. Hoewel het op dit moment onduidelijk is hoe de SpA- en Sbi-eiwitten van invloed kunnen zijn op de levensvatbaarheid van de *G. mellonella* larves, zijn de effecten beschreven in **Hoofdstuk 3** geheel consistent met een rol van deze eiwitten bij infectie van de humane gastheer door *S. aureus*.

De interacties tussen gastheer en ziekteverwekker zijn niet alleen van eminent belang voor een goed begrip van de pathofysiologie van besmettelijke ziektes, maar ook voor de behandeling en het voorkomen van dergelijke ziektes. Daarnaast moet men zich realiseren, dat infecties vaak veroorzaakt worden door meer dan één ziekteverwekker en dat de mens in het algemeen gekoloniseerd wordt door een groot aantal verschillende micro-organismen, waaronder opportunistische ziekteverwekkers. Het is daarom van belang om meer aandacht te besteden aan het natuurlijke ecosysteem dat de mens vormt en waarin ziekteverwekkers competitieve of cooperatieve interacties kunnen aangaan met andere niet-pathogene micro-organismen of met andere ziekteverwekkers. Dergelijke interacties kunnen zelfs van voordeel zijn voor zowel de gastheer als de ziekteverwekker. Met dit idee in het achterhoofd werd het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 4** opgezet. Hierbij werden mogelijke veranderingen in de gen-expressie, de eiwit-samenstelling en de virulentie van *S. aureus* onderzocht die kunnen optreden bij het gezamenlijk kweken van *S. aureus* met isolaten van de bacteriën *Klebsiella oxytoca* en *Bacillus thuringiensis* onder omstandigheden die een infectie nabootsen. Hierbij

was het van belang, dat al deze bacterie-isolaten verkregen waren uit dezelfde chronische wond van een patiënt met de erfelijke blaarziekte epidermolysis bullosa (EB), hetgeen suggereerde dat deze bacteriën zich zodanig aan elkaar hadden aangepast dat ze ‘vreedzaam’ kunnen co-existeren [17]. Eerder onderzoek had al laten zien, dat chronische wonden van patiënten met EB in grote mate gekoloniseerd zijn door *S. aureus*, maar dat deze patiënten desondanks slechts zelden invasieve *S. aureus*-infecties oplopen [18-20]. Dit suggereerde dat ze tot op zekere hoogte beschermd zijn tegen ernstige *S. aureus*-infecties. In overeenstemming met dit idee was al eerder aangetoond, dat patiënten met EB een sterkere immuunrespons tegen *S. aureus* laten zien dan gezonde vrijwilligers [21, 22]. Het was echter nog niet bekend of interacties tussen de samenlevende bacteriën in de chronische wonden van patiënten met EB op de een of andere manier de virulentie van *S. aureus* zouden kunnen beïnvloeden. Deze vraag wordt beantwoord door de studies die beschreven zijn in **Hoofdstuk 4**, waarbij verschillende bacteriën zowel afzonderlijk als ook gezamenlijk gekweekt werden en waarbij vervolgens de verschillen in gen-expressie onderzocht werden met behulp van transcriptoom- en proteoom-analyses. Daarnaast werd de onderlinge beïnvloeding onderzocht in het *G. mellonella* infectiemodel. De resultaten laten zien, dat de aanwezigheid van *K. oxytoca* of *B. thuringiensis* tot grootschalige aanpassingen leidt in de fysiologie van *S. aureus* en tot een aanzienlijke reductie van de virulentie. Deze bevindingen vormen een additionele verklaring waarom EB-patiënten, die zwaar gekoloniseerd zijn met *S. aureus* en wier huid-barrière beschadigd is door blaren en chronische wonden, slechts zelden lijden aan zware invasieve *S. aureus*-infecties. Een andere interessante waarneming betrof het feit dat *S. aureus* heel verschillende eiwitten aanmaakt in de aanwezigheid van andere bacteriën dan wanneer deze ziekteverwekker op zichzelf is. Dit zou een mogelijke reden kunnen zijn waarom het tot dusver nog niet mogelijk was om een effectief vaccin tegen *S. aureus* te ontwikkelen. In deze context is het echter wel van belang om te bedenken dat *S. aureus*, in combinatie met andere bacteriën zoals *Pseudomonas aeruginosa*, ook in staat is om de expressie van zijn virulentiefactoren te verhogen [23, 24]. Het zal daarom nog een belangrijke uitdaging zijn voor

toekomstig onderzoek om uit te vinden hoe andere micro-organismes de overgang van *S. aureus* van een relatief onschuldige commensaal tot gevaarlijke ziekteverwekker beïnvloeden. Samenvattend kan geconcludeerd worden, dat het onderzoek beschreven in dit proefschrift het belang van proteoom-analyses onderstreept om de virulentie van *S. aureus* te bestuderen en te begrijpen. Hiertoe werd een experimentele pijplijn ontwikkeld die gebaseerd was op eerdere DNA-typeringen en genoomsequentie-analyses. Deze pijplijn omvatte proteoom-analyses met een hoge doorloop en twee infectie-modellen, waardoor het mogelijk was om verschillende belangrijke virulentiefactoren van twee zeer besmettelijke *S. aureus*-varianten met *spa*-type t437 of ST398 te identificeren. Hierbij werd aangetoond dat een aantal extracellulaire eiwitten, zoals IsaA, PVL, SpA en Sbi, een rol spelen bij de infectie van *Galleria*-larves en HeLa-cellen. Deze eiwitten zijn daarom mogelijke doelwitten voor nieuwe profylactische of therapeutische methodes om *S. aureus*-infecties te voorkomen of te bestrijden. Wellicht kunnen deze eiwitten ook fungeren als biomarkers in de infectie-preventie, in het bijzonder om de snelle verspreiding van gevaarlijke *S. aureus*-varianten tegen te gaan. In dit opzicht moet benadrukt worden dat één van deze eiwitten, namelijk PVL, reeds sinds meerdere jaren beschouwd wordt als merker voor MRSA-varianten die snel van mens op mens overdraagbaar zijn, niet alleen in de context van academisch onderzoek, maar met name ook in de klinische microbiologische diagnostiek [25]. Gezien het feit dat het PVL-toxine een rol speelt bij potentieel fatale infecties, zoals een necrotiserende longontsteking, zou het van belang kunnen zijn om passieve of actieve immunisatie-benaderingen met PVL als doelwit te ontwikkelen. De waarneming dat PVL een mogelijke rol speelt bij het doden van HeLa-cellen is in dit opzicht opmerkelijk, omdat dit suggereert dat de HeLa-cellen één of meerdere PVL-receptoren bezitten. Dit roept de vraag op welke andere humane cel-types en weefsels, afgezien van leukocyten, nog meer door dit toxine beschadigd kunnen worden. Net als PVL zou ook het SpA-eiwit een aantrekkelijk doelwit voor actieve of passieve immunisatie tegen *S. aureus* kunnen zijn [26, 27]. Voor toekomstig onderzoek is het ook de moeite waard om de rol van het IsaA-eiwit in de gastheerkolonisatie en virulentie nader te bestuderen. Hiertoe zou gebruik gemaakt kunnen worden van de recentelijk ontwikkelde humane IgG1-type

monoclonale antistof 1D9 [28]. Deze antistof is zeer specifiek voor *S. aureus*, zowel *in vitro* als *in vivo* [29], en hij kan gebruikt worden voor de *in vivo* detectie van infecties met behulp van beeldvormingstechnieken, gebaseerd op fluorescentie en positron-emissie-tomografie [30, 31]. Tenslotte is het van belang om de interacties tussen *S. aureus* en andere bacteriën in een chronisch wondmilieu nader te onderzoeken, omdat ze goed het verschillende gedrag van *S. aureus* illustreren wanneer deze ziekteverwekker geïsoleerd leeft of onderdeel uitmaakt van een complexe microbiële populatie. Dergelijke studies zullen nieuwe mogelijke doelwitten voor de bestrijding van *S. aureus*-infecties opleveren en ze zullen diepere inzichten verschaffen in de prikkels die leiden tot de overgang van een commensale naar een pathogene status van de bacterie. Dergelijke studies zullen ook leiden tot een beter begrip van de interacties die *S. aureus* aangaat met de menselijke gastheer en andere micro-organismen. Deze interacties bepalen uiteindelijk de verschillende scenario's in de levensstijl van *S. aureus*, die kunnen variëren van het veroorzaken van co-infecties, zoals het geval is bij septische artritis veroorzaakt door *S. aureus* en groep B *Streptococcus* [32], tot vreedzame co-existentie, zoals het geval is bij verreweg de meeste gezonde mensen die gekoloniseerd zijn met *S. aureus*, of zelfs tot onderdrukte virulentie, zoals mogelijk het geval is in gemengde microbiële populaties in een chronisch wond-milieu.

## Referenties

1. Kusch H, Engelmann S: **Secrets of the secretome in *Staphylococcus aureus***. *Int. J. Med. Microbiol.* 2014, **304**:133-141.
2. Desbois AP, Coote PJ: **Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity and efficacy of new antimicrobial agents**. *Adv. Appl. Microbiol.* 2012, **78**:25-53.
3. Stobernack T, du Teil Espina M, Mulder LM, Medina LMP, Piebenga DR, Gabarrini G, Zhao X, Janssen KM, Hulzebos J, Brouwer E: **A secreted bacterial peptidylarginine deiminase can neutralize human innate immune defenses**. *MBio* 2018, **9**:e01704-01718.
4. Browne N, Heelan M, Kavanagh K: **An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes**. *Virulence* 2013, **4**:597-603.
5. Scully LR, Bidochka MJ: **Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens**. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, **263**:1-9.

6. Glasner C, Pluister G, Westh H, Arends JP, Empel J, Giles E, Laurent F, Layer F, Marstein L, Matussek A: ***Staphylococcus aureus* spa type t437: identification of the most dominant community-associated clone from Asia across Europe.** *Clin. Microbiol. Infect.* 2015, **21**:163.
7. Bhat M, Dumortier C, Taylor BS, Miller M, Vasquez G, Yunen J, Brudney K, Sánchez J, Rodriguez-Taveras C, Rojas R: ***Staphylococcus aureus* ST398, New York City and Dominican Republic.** *Emerg. Infect. Dis.* 2009, **15**:285.
8. Ziebandt AK, Kusch H, Degner M, Jaglitz S, Sibbald MJ, Arends JP, Chlebowicz MA, Albrecht D, Pantuček R, Doškar J: **Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation.** *Proteomics* 2010, **10**:1634-1644.
9. Mekonnen SA, Palma Medina LM, Glasner C, Tsompanidou E, de Jong A, Grasso S, Schaffer M, Mäder U, Larsen AR, Gumpert H: **Signatures of cytoplasmic proteins in the exoproteome distinguish community- and hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 lineages.** *Virulence* 2017, **8**:891-907.
10. Götz F, Yu W, Dube L, Prax M, Ebner P: **Excretion of cytosolic proteins (ECP) in bacteria.** *Int. J. Med. Microbiol.* 2015, **305**:230-237.
11. Pasztor L, Ziebandt A-K, Nega M, Schlag M, Haase S, Franz-Wachtel M, Madlung J, Nordheim A, Heinrichs DE, Götz F: **Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins.** *J. Biol. Chem.* 2010, **285**:36794-36803.
12. Ebner P, Luqman A, Reichert S, Hauf K, Popella P, Forchhammer K, Otto M, Götz F: **Non-classical protein excretion is boosted by PSM $\alpha$ -induced cell leakage.** *Cell Rep.* 2017, **20**:1278-1286.
13. Lorenz U, Lorenz B, Schmitter T, Streker K, Erck C, Wehland J, Nickel J, Zimmermann B, Ohlsen K: **Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, **55**:165-173.
14. Gómez MI, O'Seaghdha M, Magargee M, Foster TJ, Prince AS: ***Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains.** *J. Biol. Chem.* 2006, **281**:20190-20196.
15. Palmqvist N, Foster T, Tarkowski A, Josefsson E: **Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death.** *Microb. Pathog* 2002, **33**:239-249.
16. Koch TK, Reuter M, Barthel D, Böhm S, Van Den Elsen J, Kraiczy P, Zipfel PF, Skerka C: ***Staphylococcus aureus* proteins Sbi and Efb recruit human plasmin to degrade complement C3 and C3b.** *PloS one* 2012, **7**:e47638.
17. García-Pérez AN, de Jong A, Junker S, Becher D, Chlebowicz MA, Duipmans JC, Jonkman MF, van Dijk JM: **From the wound to the bench: exoproteome interplay between wound-colonizing *Staphylococcus aureus* strains and co-existing bacteria.** *Virulence* 2018, **9**:363-378.

18. van der Kooi-Pol MM, Duipmans JC, Jonkman MF, van Dijl JM: **Host–pathogen interactions in epidermolysis bullosa patients colonized with *Staphylococcus aureus***. *Int. J. Med. Microbiol.* 2014, **304**:195-203.
19. van der Kooi-Pol MM, Sadabad MS, Duipmans JC, Sabat AJ, Stobernack T, Omansen TF, Westerhout-Pluister GN, Jonkman MF, Harmsen HJ, van Dijl JM: **Topography of distinct *Staphylococcus aureus* types in chronic wounds of patients with epidermolysis bullosa**. *PLoS One* 2013, **8**:e67272.
20. van der Kooi - Pol MM, Veenstra - Kyuchukova YK, Duipmans JC, Pluister GN, Schouls LM, de Neeling AJ, Grundmann H, Jonkman MF, van Dijl JM: **High genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients with epidermolysis bullosa**. *Exp. Dermatol.* 2012, **21**:463-466.
21. Swierstra J, Debets S, de Vogel C, Lemmens-den Toom N, Verkaik N, Ramdani-Bouguessa N, Jonkman MF, van Dijl JM, Fahal A, van Belkum A: **IgG4 subclass-specific responses to *Staphylococcus aureus* antigens shed new light on host-pathogen interaction**. *Infect. Immun.* 2015, **83**:492-501.
22. Van Der Kooi-pol MM: **High anti-staphylococcal antibody titers in patients with epidermolysis bullosa relate to long-term colonization with alternating types of *Staphylococcus aureus***. *J. Invest. Dermatol.* 2013, **133**:50.
23. Baldan R, Cigana C, Testa F, Bianconi I, De Simone M, Pellin D, Di Serio C, Bragonzi A, Cirillo DM: **Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airways influences virulence of *Staphylococcus aureus* in vitro and murine models of co-infection**. *PLoS One* 2014, **9**:e89614.
24. Biswas L, Biswas R, Schlag M, Bertram R, Götz F: **Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa***. *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:6910-6912.
25. Diep BA, Otto M: **The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis**. *Trends microbiol* 2008, **16**:361-369.
26. Chen X, Sun Y, Missiakas D, Schneewind O: ***Staphylococcus aureus* decolonization of mice with monoclonal antibody neutralizing protein A**. *J. Infect. Dis* 2019, **219**:884-888.
27. Thammavongsa V, Rauch S, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O: **Protein A-neutralizing monoclonal antibody protects neonatal mice against *Staphylococcus aureus***. *Vaccine* 2015, **33**:523-526.
28. van den Berg S, Bonarius HP, van Kessel KP, Elsinga GS, Kooi N, Westra H, Bosma T, van der Kooi-Pol MM, Koedijk DG, Groen H: **A human monoclonal antibody targeting the conserved staphylococcal antigen IsaA protects mice against *Staphylococcus aureus* bacteremia**. *Int. J. Med. Microbiol.* 2015, **305**:55-64.
29. Romero Pastrana F, Thompson JM, Heuker M, Hoekstra H, Dillen CA, Ortines RV, Ashbaugh AG, Pickett JE, Linssen MD, Bernthal NM: **Noninvasive optical and nuclear imaging of *Staphylococcus*-specific infection with a human monoclonal antibody-based probe**. *Virulence* 2018, **9**:262-272.

30. Sheppard WL, Mosich GM, Smith RA, Hamad CD, Park HY, Zoller SD, Trikha R, McCoy TK, Borthwell R, Hoang J: **Novel in vivo mouse model of shoulder implant infection.** *J. Shoulder. Elbow. Surg.* 2020.
31. Zoller SD, Park HY, Olafsen T, Zamilpa C, Burke ZD, Blumstein G, Sheppard WL, Hamad CD, Hori KR, Tseng J-C: **Multimodal imaging guides surgical management in a preclinical spinal implant infection model.** *JCI insight* 2019, **4**:124813.
32. Ruksasakul R, Narongroeknawin P, Assavatanabodee P, Chaiamnuay S: **Group B streptococcus is the most common pathogen for septic arthritis with unique clinical characteristics: data from 12 years retrospective cohort study.** *BMC Rheumatol* 2019, **3**:38.



## List of publications

**Xin Zhao\***, Laura M. Palma Medina\*, Tim Stoberneck, Corinna Glasner, Anne de Jong, Putri Utari, Rita Setroikromo, Wim J. Quax, Andreas Otto, Dörte Becher, Girbe Buist, and Jan Maarten van Dijl. **Exoproteome heterogeneity among closely related *Staphylococcus aureus* t437 isolates and possible implications for virulence.** *J Proteome Res* 2019, 18:2859-2874.

**Xin Zhao**, Monika A. Chlebowicz-Flissikowska, Min Wang, Elias Vera Murguia, Anne de Jong, Dörte Becher, Sandra Maaß, Girbe Buist, and Jan Maarten van Dijl. **Exoproteomic profiling uncovers critical determinants for virulence of livestock-associated and human-originated *Staphylococcus aureus* ST398 strains.** Submitted for publication.

Andrea N. García-Pérez, **Xin Zhao**, Anne de Jong, Sabryna Junker, Dörte Becher, José C. Duipmans, Marcel F. Jonkman, and Jan Maarten van Dijl. **Pathogen-pathogen interactions in the microbiome, a way to soothe virulence?** Submitted for publication.

Tim Stoberneck, Marines du Teil Espina, Lianne M. Mulder, Laura M. Palma Medina, Dillon R. Piebenga, Giorgio Gabarrini, **Xin Zhao**, Koen M. J. Janssen, Jarnick Hulzebos, Elisabeth Brouwer, Thomas Sura, Dörte Becher, Arie Jan van Winkelhoff, Friedrich Götz, Andreas Otto, Johanna Westra, Jan Maarten van Dijl. **A secreted bacterial peptidylarginine deiminase can neutralize human innate immune defenses.** *mBio* 2018, 9:e01704-18.

**Xin Zhao**, Zhiguang Chang, Zhiwei Tu, Shengchao Yu, Xiaoyan Wei, Jianhua Zhou, Huijun Lu, Qijun Chen and Ning Jiang. **PfRON3 is an erythrocyte-binding protein and a potential blood-stage vaccine candidate antigen.** *Malar. J* 2014, 13:490.

Yan Zhang, Ning Jiang, Boyin Jia, Zhiguang Chang, Yana Zhang, Xiaoyan Wei, Jianhua Zhou, Henan Wang, **Xin Zhao**, Shengchao Yu, Meng Song, Zhiwei Tu, Huijun Lu, Jigang Yin, Mats Wahlgren and Qijun Chen. **A comparative study on the heparin-binding proteomes of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*.** *Proteomics* 2014, 14:1737-1745.

## Biography

Xin Zhao was born on the 27<sup>th</sup> of April 1987 in Shandong, China. From 2007 to 2012, he studied Veterinary Medicine at Qingdao Agricultural University and Heze University, China, for which he obtained his BSc. Subsequently, he obtained his MSc in Parasitology at Jilin University, China, where he studied under the supervision of Prof. Ning Jiang (2012 – 2015). The topic of his dissertation was “expression and function analysis of *Plasmodium falciparum* rhoptry neck protein 3”. In October 2015, he started his PhD research on *Staphylococcus aureus* virulence at the Department of Medical Microbiology of the University of Groningen, the Netherlands, under the supervision of Prof. Jan Maarten van Dijk, which resulted in the present thesis.

## Acknowledgements

In the last four and a half years, I have gone through an extraordinary experience during the long journey of obtaining my PhD in Groningen, the Netherlands. I would like to thank all the people who supported and helped me to finish this thesis.

First of all, I would like to express my sincere gratitude to my promoter: Jan Maarten Van Dijk. This great adventure would have never happened if you would have not accepted to meet me over Skype and later invite me to join in your research group five years ago. It is a great honor and pleasure working with you during the course of my PhD. Looking back on these four and a half years, I really have learned so much from you, and thanks to you I have grown a lot, both scientifically and personally. More importantly, your optimistic attitude toward life and work deeply infected me and changed my vision of myself. I would like to thank you for all your trust, support and kindness you have given me, numerous project discussions and text revisions in front of your computer, the conferences we have taken together and all the fun we ever had. Thank you so much for being my best promoter I could ever imagine. Thanks also to Rita for her support in translating and correcting my Dutch summary, and hosting our MolBac parties at your place.

I also would like to express my appreciation to my co-promotor: Girbe Buist. I am very thankful for your time to discuss my project and to give me your constructive views. Thanks for all your critical checks and feedbacks on my manuscripts. Your professional and extensive knowledge about bacterial proteins honestly helped me a lot.

I am most grateful to the members of my thesis assessment committee, Prof. Sven Hammerschmidt, Prof. Arnold J.M. Driessen, and Prof. Oscar Kuipers. I thank you for the time and effort you put into reading and approving my thesis.

My sincere gratitude to my paranympths, Elias and Min. Thank you for being my support at this special moment. Thank you, Min, for our many extensive communications, lab works, scientific discussions, conferences and social activities we had taken together during the last two and a half years. Elias, you have certainly enlightened me quite a lot, especially when we talked about the current world politics. I will always remember your friendliness and hope to

keep in touch in the future.

I am very grateful to Prof. Dörte Becher, Dr. Andreas Otto, Dr. Sandra Sandra Maaß, Dr. Anne de Jong, Dr. Putri Utari, Rita Setroikromo, Prof. Wim J. Quax, and Dr. Monika Chlebowicz-Flissikowska for the very productive and pleasant collaborations.

A huge thanks to my colleagues from the MolBac group. I am grateful for having been part of this awesome research group for these years. So many great people, great scientists, working in this wonderful lab. Rense, Dennis and Jolanda thanks for helping with lots of lab-related stuff and keeping our lab in working order. Thank you, Solomon, for your help in getting my PhD started and all the nice times we had. Thank you, Tim, for sharing your knowledge with me, helping me with proteomic data analysis in the beginning and for many very useful scientific discussions. I have always admired your Intelligence in both work and life. Many thanks to Sjouke, for helping me whenever I needed help in the lab and helping me solve the problem. It is always fun to talk with you about Chinese language and culture. Thank you, Stefano, my desk mate in office during the first two years of my PhD, I really enjoyed the time when we smoked together. Thank you, Bimal, for our many interesting conversations, poker nights, games, dinners, conferences and all the nice time we spent outside the lab. I do hope that we can see each other somewhere in China in the near future. Thank you, Giorgio, for your always kindness and warm heart. Marco, you are a really nice and easy-going man. I enjoyed all the time with you. Thank you, Rocio, for our many deep conversations, your cares and hosting me many dinner parties and social activities in your place throughout my entire PhD. I very much appreciated all the time we spent together and wish you all the best. Thank you, Gaby, for all the parties and dinners you organized. I will always remember all the fun we had together, especially the great time in your landlord's place. Yaremit, you are a very nice and friendly colleague, it was always great talking with you. Lu, you've grown a lot since you started your PhD. I wish you all the best and a lot of fun for your future. Laura, you are truly a smart girl and scientist, working with you benefit me a lot. Thank you for the excellent collaboration in the first story of my thesis. Thank you, Francis, it was always a pleasure to talk and chill out with you whenever we had the chance. Marina, my drinking buddy, you are a

very cheerful girl, full of joys and passions every day. Thank you for all the drinking time spent with you. Thank you, Andrea, for the stimulating collaboration which has resulted in Chapter 4 of my thesis. I wish you good health and joyful life. Thank you, Elisa, for all your helps and accompany during the conference in New York. I honestly could not make it without you. I also would like to thank you the cover photo of my thesis you supported. Thank you, Suruchi, for our many nice conversations we had about life. Thank you, Margarita and Marines, for lots of fun conversations during our social events. I wish you both success for the rest of your PhD. Lisanne, Usma, Rita and Mafalda thank you for your help and being great colleagues during my PhD. Thank you, Yanyan, for the fun travelling time in Belgium. Lei, it's a great pleasure to know you before I leave.

In the end I would like to thank my parents. 爸，妈，谢谢你们培养我成人，谢谢你们无条件的支持走到现在，我无法报答更多，期待这个疫情结束，期待很快见到你们！

Thank you very much, everyone!

Xin

March 2020

Groningen, the Netherlands